

明 細 書

アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化を増幅するための試薬

技術分野

- [0001] 本発明は、アミロイド線維化したアミロイド β 蛋白質(以下、 $A\beta$ と略す。)の増幅方法とそのための試薬に関するもので、アルツハイマー病やプリオン病等のアミロイドーシスの予兆診断法の基盤となるものである。

背景技術

- [0002] アルツハイマー病は1907年にドイツの神経病理学者Alois Alzheimerによって報告された疾患である。発症年齢は初老以降であり、進行性の痴呆が症状の中核となる疾患である。痴呆とは正常であった知的機能が徐々に障害された結果、日常生活に障害をきたしてくる状態をいう。アルツハイマー病の場合に症状として最初に現れてくるものは、物忘れに代表されるような記憶力の障害である。さらに、失語、失認、失行などを含む様々な知的機能の障害も加わり、徐々に進行性の経過をとり、末期には寝たきり、失禁など高度の痴呆状態へと至る。病理学的には脳のび漫性の萎縮と神経細胞の脱落に加え、老人班、神経原線維変化と呼ばれる特徴的な構造物が数多く観察される。これらの変化は特に海馬において著しい傾向にある。

神経原線維変化はAlzheimerが初めて記載した変化で、神経細胞全体の嗜銀性の線維状構造物の蓄積を指す。その線維は特徴的な二重らせん構造をとっていることからPaired helical filaments (PHF)と名付けられた。しかしPHFは多くの神経疾患で出現することが発見されたことから、現在ではPHFの形成は神経細胞が変性していく過程における非特異的な反応様式であると考えられている。

老人班は元来、中心に密集したアミロイド線維があり、その周囲に変成しつつある神経突起、アストロサイトなどが集まった構造全体を定義していた。アミロイド線維は種々の溶媒に不溶であるので、この性質を利用してアルツハイマー病脳の髄膜血管および脳実質から精製され、その構成成分が分子量約4kDの新しいペプチドであるアミロイド β 蛋白質($A\beta$)と同定された。分子量が小さいことからその前駆体の存在が予測され、cDNAクローニングによりAPP (β Amyloid protein precursor)が同

定された。これは一回膜貫通型の膜蛋白質であり、 $A\beta$ はAPPの細胞外ドメインから膜ドメインの内部2残基までであることが判った。

その後、単離された $A\beta$ から抗 $A\beta$ 抗体が作製され、アルツハイマー病患者の脳を抗体染色したところ、以前から知られていた球状の老人班の他に多くの形態での $A\beta$ の存在が観察され、アミロイド沈着はこれまでの考えよりも遙かに広範に渡っていることが明らかとなった。アミロイド沈着のなかにはその程度が軽く、変成神経突起を伴わないものがある。これはび慢性老人班と名付けられ、アルツハイマー病の初期病理像であると考えられ、アルツハイマー病に特異的なものとして広く支持されている。

近年、アルツハイマー病やプリオン病などの致死性のアミロイドーシス(amyloidosis:アミロイドが細胞周囲や組織間隙に沈着し機能障害をおこす疾患)において、蛋白質のミスフォールド体形成やアミロイド線維形成が重要な段階であることが明らかになりつつあり、アミロイド線維を検出することはアミロイドーシスの診断において極めて重要である。

[0003] $A\beta$ とはアミノ酸40残基もしくは42残基で構成されるペプチドで、それぞれ $A\beta$ (1-40) および $A\beta$ (1-42)と呼ばれ、アルツハイマー病の発症過程において重要な役割を果たしていると考えられている。 $A\beta$ はアミノ酸695残基から770残基で構成される一回膜貫通蛋白質であるAPPから酵素(β -secretase, γ -secretase)によって切り出されて生成し、健康な人の脳内には0.1nM〜10nM程度の濃度でモノマーの $A\beta$ (1-40)が存在しているとされ、 α -secretaseによって分解され代謝される。

$A\beta$ (1-40)は生理的条件下においてランダムコイル状態で存在し、 $A\beta$ (1-40)が生成する場合は脳内に沈着することなく α -secretaseによって代謝される。しかし $A\beta$ (1-42)は生理的条件下において、ランダムコイル状態から集合化して α -ヘリックス構造を経由し β シート構造をとる。その後 β シート構造の $A\beta$ は更に重合しアミロイド線維化してプロテアーゼ耐性を獲得する。そして不溶化して脳内に沈着し老人班を形成する。このことがアルツハイマー病発症過程において重要であると考えられている。しかし $A\beta$ (1-42)は稀にしか生成せず、その生成機構およびアミロイド線維化の機構も良く判っていない。

[0004] アルツハイマー病の診断は、初期段階ではDSM-4(米国精神医学協会から公示

されたアルツハイマー病の診断基準)等を用いた精神医学的な手法が大部分を占めている。しかし精神医学的な手法ではアルツハイマー病初期段階における確定診断が難しく、またアルツハイマー病患者およびその家族がその症状に気付く頃にはその病状がかなり進行していることが多い。また、中期段階以降はMRIにより脳の萎縮を判定することで診断が可能だが、ごく初期段階においては脳の萎縮が始まっていないので診断することは難しい。

またその他の診断法として低濃度のトロピカミド(アセチルコリン受容体アンタゴニスト;アルツハイマー病患者はアセチルコリン受容体が減少するのでアセチルコリン受容体アンタゴニストに対して過敏になる)点眼に対する瞳孔の散大、および固視による記憶力テスト(アルツハイマー病においては海馬の損傷が著しく、それをテストする)などがあるが、現時点では信頼性が低く、副次的な診断法としてしか用いられていない。現時点では、ごく初期段階のアルツハイマー病の診断は非常に難しく、そのことがアルツハイマー病の治療をより一層困難なものとしている。

発明の開示

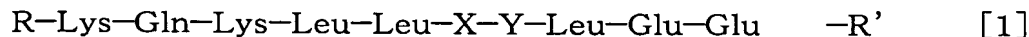
発明が解決しようとする課題

- [0005] $A\beta$ のアミロイド線維沈着はアルツハイマー病に特異的であり、アルツハイマー病の他の症状に先行するので、アルツハイマー病のごく初期段階においてアミロイド線維化した $A\beta$ を検出することが可能となれば、アルツハイマー病の初期段階の確定診断が可能になると考えられる。しかし、アルツハイマー病の初期段階において、アミロイド線維化した $A\beta$ はごく微量であるため、現時点では検出が困難である。そこで、微量のアミロイド線維化した $A\beta$ を増幅することが可能となれば、初期段階でのアルツハイマー病検出に多大な応用が期待される。

本発明は、斯かる状況に鑑みなされたもので、アミロイド線維化した微量の $A\beta$ の核とテンプレート反応を起こしてアミロイド線維を形成し、線維を増量して増幅する天然ペプチドの探索、並びにそれに代り得る新たな人工ペプチドの設計、開発と、これらを用いたアミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化増幅方法及びそれに用いる試薬、並びにアミロイドーシスに起因する疾病の検出方法及びそれに用いる試薬を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明は、アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド[以下、A β (14-23)と略す。]又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化を増幅するための試薬に関する。
- [0007] また、本発明は、アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド[A β (14-23)]又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる試薬を用いることを特徴とする、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化増幅方法に関する。
- [0008] 更に、本発明は、アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド[A β (14-23)]又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる、アミロイドーシスに起因する疾病の検出用試薬に関する。
- [0009] 更にまた、本発明は、アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド[A β (14-23)]又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる試薬を用いることを特徴とする、アミロイドーシスに起因する疾病の検出方法に関する。
- [0010] また、本発明は、下記一般式[1]



(式中、Rは、水素原子又はアミノ基の保護基を表し、Xは、Leu、Phe又はAlaを表し、Yは、Leu又はPheを表し、R'は、OH又はNH₂を表す。)

で示されるペプチドに関する。

発明の効果

- [0011] 本発明に係る、アミロイドーシスに起因する疾病の検出用試薬によれば、体内にあるアミロイド線維の核を安全な人工ペプチドを利用して増幅し、検出不可能な原因蛋白質を予兆段階の検査において増幅して検出可能なレベルにすることが出来るので、アルツハイマー病やプリオン病(狂牛病やヒトのヤコブ病など)等のアミロイドーシスに起因する疾病を初期段階で検出することが出来る。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]実施例1で合成した各ペプチドについて、25℃でCDスペクトルの測定を行った結果を示す。図1中、(1)はインキュベーション前(=0日)、(2)はインキュベーション(1日)後の測定結果をそれぞれ示す。

[図2]A β (10-35)存在下でのThTの経時的な蛍光スペクトルの変化(A)と、482nmにおける蛍光強度のタイムコース(B)を示す。[実施例2の(1-2)]

[図3]実施例2の(1-2)において、蛍光強度の変化が終了したサンプルをTEMを用いて観察した結果を示す。

[図4]本発明に係る各ペプチド存在下でのThTの482nmにおける蛍光強度を、それぞれインキュベーション(室温)の前と後について測定、比較したものであり、□はインキュベーション前、■はインキュベーション後の結果をそれぞれ示す。[実施例2の(1-3)]

[図5]本発明に係る各ペプチド存在下でのThTの482nmにおける蛍光強度を、それぞれインキュベーション(40℃)の前と後について測定、比較したものであり、□はインキュベーション前、■はインキュベーション後の結果をそれぞれ示す。[実施例2の(1-3)]

[図6]実施例2の(1-3)において、人工ペプチド(10-3L)を用い、40℃でインキュベーションを行ない、蛍光強度変化が終了した後のサンプルをTEMにより観察した結果を示す。

[図7]本発明に係る各ペプチド存在下でのThTの482nmにおける蛍光強度を、線維化させたA β (10-35) (核)を添加、非添加のそれぞれの場合について測定、比較したものである。図7中、□は核無し(1日後)、■は核10 μ M添加(1日後)の結果をそれぞれ示す。[実施例2の(2)]

[図8]図8は、線維化させたA β (10-35) (核)を添加した場合と添加しなかった場合の、本発明に係る各ペプチド存在下でのThTの490nmにおける蛍光強度の増加の程度を示したものである。図8中、□はA β (10-35)無添加の場合、■はA β (10-35)を添加した場合の結果をそれぞれ示す。[実施例3]

発明を実施するための最良の形態

[0013] 本発明において用いられる、A β (14-23)としては、天然のものでも、ペプチド合成法の常法に従って合成したものでも何れでも良い。

本発明において用いられる、A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドとしては、例えば、A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドであって、更にペプチド鎖内部の疎水性残基の1乃至複数個が他の疎水性アミノ酸残基に置換されてなるペプチドが、好ましいものとして挙げられる。置換し得る他の疎水性アミノ酸残基としては、例えば、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、フェニルアラニン(Phe)、バリン(Val)等のアミノ酸残基が挙げられる。

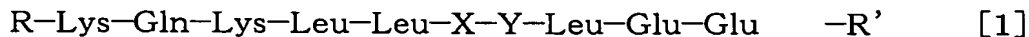
そのようなペプチドの好ましい具体例としては、例えば、A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドであって、更に、i) ペプチド鎖内部の疎水性残基が全てLeuに置換された形のもの、ii) ペプチド鎖内部の疎水性部位のN末端側から3残基目或いは4残基目のPheを残して全てLeuに置換された形のもの、或いは、iii) 疎水性部位のN末端側から3残基目がAlaに置換され、残りの疎水性残基が全てLeuに置換された形のもの等が挙げられるが、勿論これらに限定されるものではない。

[0014] 本発明に係る、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化を増幅するための試薬、及び本発明に係る、アミロイドーシスに起因する疾病の検出用試薬は、上記した如きA β (14-23)又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる点に特徴を有する。

また、本発明に係る、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化増幅方法、及び本発明に係る、アミロイドーシスに起因する疾病の検出方法は、上記した如きA β (14-23)又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる試薬を用いる点に特徴を有する。

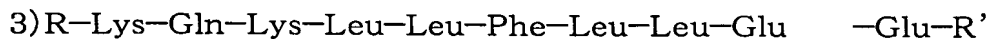
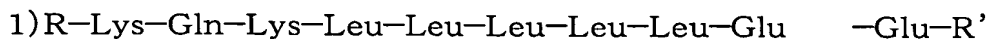
[0015] 本発明に係る、A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドの好ましい具体例を一般

式で示すと、例えば、以下のようになる。



(式中、Rは、水素原子又はアミノ基の保護基を表し、Xは、Leu、Phe又はAlaを表し、Yは、Leu又はPheを表し、R'は、OH又はNH₂を表す。)

[0016] 上記一般式[1]で示されるペプチドの好ましい具体例としては、例えば、下記の如きものが挙げられる。



(上記式中のR及びR'は前記と同じ。)

上記1)～4)に示されるペプチドは何れも新規化合物である。

[0017] 上記一般式[1]において、Rで表されるアミノ基の保護基としては、例えば、アセチル基、t-ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、フルオレニルメトキシカルボニル基、ベンゾイル基等のアシル基や、フルオレッセイン基、オレゴングリーン基等の蛍光性アシル基などが挙げられるが、より簡便なアセチル基が好ましい。

なお、上記1)～4)に示されるペプチドにおけるRもこれと全く同様である。

[0018] 本発明において用いられる、Aβ(14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドの好ましい具体例としては、上記一般式[1]で示されるものの他に、例えば、一般式[1]において、Xが、ペプチド鎖内部の疎水性部位のN末端側から1残基目、2残基目、或いは5残基目の位置にあるものや、一般式[1]におけるLeuがIleに置き換わったもの、或いは一般式[1]におけるXやYがIleに置き換わったもの等々が挙げられる。

[0019] これら本発明に係るペプチド類は、何れも、ペプチド合成器を用いたBoc固相合成法やFmoc固相合成法等の常法により容易に合成し得る。

[0020] 本発明に係る、アミロイドーシスに起因する疾病の検出用試薬、或いはアミロイドーシスに起因する疾病の検出方法により検出可能な疾病としては、先ず第一にアルツハイマー病が挙げられる。また、例えば、狂牛病やヒトのヤコブ病などのプリオン病も

同様に検出可能である。その他、アミロイドーシスに起因する各種疾病が同様に検出し得る。

これらアミロイドーシスに起因する各種疾病は、本発明に係るペプチドを含んでなる検出試薬を用いることにより、予兆段階、初期段階において、感度良く検出することが出来る。

[0021] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0022] (1) ペプチド Ac-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Leu-Phe-Leu-Glu-Glu-NH₂ [ペプチド(10-4F)]の合成

(1-1) 試薬、機器・装置

Fmocアミノ酸誘導体および固相担体としての樹脂は、ノババイオケム(Novabiochem)社より購入し、そのまま用いた。他の試薬は市販品のものをそのまま使用した。

ペプチドはFmoc(9-フルオレニルメトキシカルボニル)固相法により手動で合成した。ペプチド鎖の手動合成容器にはポリプロピレン製エンブティーカラム(ファルマシア バイオテック社製)を用いた。吸収スペクトルは、SHIMADZU BioSpc-1600 Spectrometerを用いて測定した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)には、HITACHI 7000 systemを用いた。HPLC溶媒として、A液:0.1%TFA/H₂O、B液:0.08%TFA/CH₃CNの混合溶媒を用い、30分間でA液とB液の直線勾配により溶出した。逆相カラムとして分析にはCosmosil 5C18-AR-2(Nacalai tesque)(4.6×150 mm)を流速1ml/minで使用した。ペプチドの精製にはCosmosil 5C₁₈-AR-2(ナカライ テスク)(10×250 mm)を流速3ml/minで使用した。検出波長には220nmを用いた。飛行時間型質量分析(TOF-MS)はSHIMADZU K Ratos MALDI IIIを用いて行い、マトリックスとして3, 5-ジメトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸(シナピン酸)を用いた。蛍光プレートリーダーは、BERTHOLD Twinkle L B970を用いた。

[0023] (1-2) ペプチド(10-4F)の合成

10-4Fの合成はFmoc固相法により20 μmolスケールで行った。樹脂はNovaSy

n TGR resinを用いた。各アミノ酸残基のカップリングは樹脂上のアミノ基に対して3当量のFmoc-アミノ酸(Fmoc-AA-OH)を用いて反応を完全に進行させるようにした。本実施例ではFmoc-AA-OHとしてFmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Phe-OH、(t-Bu:tert-ブチル、Trt:トリチル、Boc:tert-ブトキシカルボニル)を使用した。カップリング試薬として、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート(HBTU) (3当量)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(HOBt-H₂O) (3当量)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA) (6当量)を用いた。反応溶媒としてN-メチルピロリドン(NMP)を使用した。Fmoc基の除去には20%ピペリジン(PPD)/NMPを使用した。アミノ酸誘導体をカルボキシル末端から順次カップリングした。反応中は適宜ボルテックスで攪拌し、カップリングの終了をKaiser Test(KT)により確認した。全てのアミノ酸をカップリング後、アミノ末端のアミノ酸のFmoc基を除去した後、NMP中で無水酢酸(10等量)を用いてペプチドのN末端のアミノ基をアセチル化した。その後、樹脂をNMP、クロロホルムで順次洗浄し、4時間減圧乾燥した。

減圧乾燥した樹脂を50mlナスフラスコに取り、m-クレゾール(0.13ml)、チオアニソール(0.38ml)及びトリフルオロ酢酸(TFA)(5ml)を順次加え室温で1時間攪拌し反応させた。エバポレーターを用いてTFAを除去した後、約30 mlのジエチルエーテルを加えてペプチド(10-4F)を沈殿させた。遠心分離器(3000rpm、5分)にかけデカンテーションを5回繰り返した後、ジエチルエーテルを窒素気流下で気化させた。沈殿を減圧乾燥し、粗ペプチド(10-4F)を得た。得られた粗ペプチド(10-4F)を逆相HPLCにより精製し、CH₃CNをエバポレーターで除去した後、凍結乾燥し回収した。収率35%。得られたペプチド(10-4F)はMALDI-TOFMSを用いて同定した。

MALDI-TOFMS:

実測値(M+H⁺)1301.6。

計算値(M+H⁺)1302.5。

[0024] (2) ペプチドAc-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Glu-Glu-NH₂ [

ペプチド(10-3L)]、ペプチドAc-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Phe-Leu-Leu-Glu-Glu-NH₂ [ペプチド(10-3F)]及びペプチドAc-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Glu-Glu-NH₂ [ペプチド(10-3A)]の合成。

上記(1)で用いたと同じ試薬及び機器・装置を用い、上記(1)に記載の方法と同様の方法でペプチド合成及び逆相HPLCによる精製を行ない、ペプチド(10-3L)、ペプチド(10-3F)及びペプチド(10-3A)をそれぞれ合成した。

得られた、これらペプチドのMALDI-TOFMSを以下に示す。

ペプチド(10-3L):実測値(M+H⁺)1290.1

計算値(M+H⁺)1290.6

ペプチド(10-3F):実測値(M+H⁺)1302.2。

計算値(M+H⁺)1302.5。

ペプチド(10-3A):実測値(M+Na⁺)1226.2。

計算値(M+Na⁺)1226.5。

[0025] (3) A β (14-23)及びA β (10-35)の合成

上記(1)で用いたと同じ試薬及び機器・装置を用い、上記(1)に記載の方法と同様にして、アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド[A β (14-23)]、及びアミロイド線維の核として、疎水性残基に富み線維形成能が高いことが知られている、アミロイド β ペプチドの10残基から35残基からなるペプチド[A β (10-35)]を合成した。

得られたこれらペプチドのMALDI-TOFMSを以下に示す。

A β (14-23):実測値(M+H⁺)1274.8

計算値(M+H⁺)1274.4

A β (10-35):実測値(M+H⁺)2946.5

計算値(M+H⁺)2945.3

本実施例で合成した各ペプチドについて、25℃でCDスペクトルの測定を行った結果を図1に示す。図1中、(1)はインキュベーション前(=0日)、(2)はインキュベーション(1日)後の測定結果をそれぞれ示す。

実施例 2

[0026] (1) 人工ペプチド単独でのアミロイド線維形成

実施例1で合成したペプチド(10-4F)、(10-3L)、(10-3F)、(10-3A)、A β (14-23)及びA β (10-35)単独の水溶液中でのアミロイド線維形成能を評価した。CDスペクトルを用いて二次構造を調べ、アミロイド線維に特異的に結合して蛍光を発する色素チオフラビンT(ThT)及び透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて線維形成能を評価した。

[0027] (1-1) CDスペクトルを用いたペプチドの二次構造測定

合成した各ペプチドについて、[ペプチド]=2mMのトリフルオロエタノール(TFE)溶液を作製し、それぞれ原料溶液とした。それを20mMトリス-HCl緩衝液(pH7.4)中へと希釈し、ペプチドの終濃度を100 μ Mとして常温でインキュベートし、25°CでCDスペクトルの測定を行った(図1)。

その結果、10-4F、10-3L、10-3F及びA β (10-35)は初めから218nm付近に負の極大を持ち、205nm付近に正の極大を持つ β -シート構造に特有のスペクトルを取り、更に、時間経過と共にシグナルが増大し、 β -シート性が強まったことから、アミロイド線維形成の進行が示唆された。また、10-3A及びA β (14-23)は何れもランダムコイル状態に特有のスペクトルを示し、経時的なスペクトルの変化は示さなかった。

人工ペプチドのうち、疎水性の低いAlaを導入したペプチドがランダムコイル状態で、それ以外のペプチドが β -シート構造をとったことから、ペプチド鎖内部の疎水性がアミロイド線維化には重要であることが示唆された。

[0028] (1-2) ThTを用いたA β (10-35)のアミロイド線維化条件選定

ThT(λ_{ex} =440nm、 λ_{em} =482nm)を用いてA β (10-35)のアミロイド線維化を追跡し、アミロイド線維の核として用いるA β (10-35)のインキュベーション条件を選定した(図2)。

インキュベーション条件

- ・使用原料溶液:[A β (10-35)]=2mM TFE溶液
- ・濃度:[A β (10-35)]=100 μ M トリス-HCl 20mM溶液(pH7.4)
- ・温度:室温

測定条件

- ・濃度: $[A\beta(10-35)] = 5\mu M$ 、 $[ThT] = 6\mu M$
(トリス-HCl 20mM溶液 (pH7. 4))
- ・温度: 室温
- ・攪拌条件: 試料サンプリング前にパスツールピペットで全量を十分に攪拌
セル内でパスツールピペットを用い全量を十分に攪拌
- ・励起波長: 440nm、検出波長: 482nm

[0029] 結果

$A\beta(10-35)$ はThTの存在下で482nm付近の蛍光強度を経時的に増大させ、グラフにプロットすると、シグモイド型の変化を示した。これは、アミロイド性タンパク質に特徴的な自己複製、自己触媒反応を示唆する。また、蛍光強度の変化が終了したサンプルをTEMを用いて観察したところ、線維が観察された(図3)。

変化は大体24時間から30時間の間に終了し、アミロイド線維化終了時の蛍光強度および終了までの時間の再現性が良好なことから、核としてこの条件で30時間以上インキュベートし、ThT存在下の蛍光強度が700〜1000程度の値を示したものを $A\beta$ の核として使用することとした。

[0030] (1-3) ThTを用いた人工ペプチド単体でのアミロイド線維形成能評価

ThTを用いて、実施例1で得られた人工ペプチド単体でのアミロイド線維形成能を評価した。

インキュベーション条件

- ・使用原料溶液: $[ペプチド] = 2mM$ TFE溶液
- ・濃度: $[ペプチド] = 200\mu M$ トリス-HCl 20mM溶液 (pH7. 4)
- ・温度: 室温又は40°C

測定条件

- ・濃度: $[ペプチド] = 5\mu M$ 、 $[ThT] = 6\mu M$
(トリス-HCl 20mM溶液 (pH7. 4))
- ・温度: 室温
- ・攪拌条件: 試料サンプリング前にパスツールピペットで全量を十分に攪拌

セル内でパスツールピペットを用い全量を十分に攪拌

・励起波長:440nm、検出波長:482nm

[0031] 結 果

(i) 室温(常温)でインキュベーションを行った場合

人工ペプチド10-3L、10-3F、10-4Fでは時間経過と共に顕著な蛍光強度増大を示し、人工ペプチド単体でアミロイド線維を形成する能力があることが示唆された。また10-3Aはまったく蛍光強度増大を示さなかった。蛍光強度増大が終了するまでにかかった時間は10-3Lが3日間と一番短く、10-3F、10-4Fは6日間かかった。また終点での蛍光強度は、10-3Lと10-4Fが同程度で、10-3Fは、10-3L、10-4Fの半分弱だったことから、単体でのアミロイド線維形成能は10-3L、10-4Fが高く、10-3Fは低いことが判った。

各人工ペプチドの蛍光強度増大前後における蛍光強度の比較を図4に示す。

[0032] (ii) 40℃でインキュベーションを行った場合

次に、常温では線維化が遅く、経時変化を追跡しづらいので、線維形成が早まると考えられる40℃の高温での人工ペプチド単体での線維形成能を評価した。

A β (14-23)、10-3Lは顕著に線維化終了が早まり、10-3F、10-4Fは線維化終了までの時間はほぼ変化しなかった。10-3Aはほとんど蛍光強度増大を見せなかった。また、全体的に線維化終了時の蛍光強度が低下した。

各人工ペプチドの蛍光強度増大終了時における蛍光強度の比較を図5に示す。

また、蛍光強度変化が終了した後のこれらのサンプルをTEMにより観察したところ、10-3L、10-4Fに線維が観察された(図6)。このことから、10-3L、10-4Fが線維を形成することが確認された。

[0033] 上記の結果をまとめると、殆ど全ての条件において、10-3L、10-3F、10-4Fが蛍光強度増大を示し、特に10-3L、10-4Fが顕著であることが判る。このことから、10-3Lと10-4Fは高いアミロイド線維形成能を持つことが示唆された。

また、疎水性の低いAlaを導入した10-3Aがランダムコイル状態のスペクトルを示し、ThTでも全く蛍光強度増大を示さなかったことから、ペプチド鎖内部の疎水性が β -シート構造形成およびアミロイド線維形成に際して重要であることが示唆される。

[0034] (2) 人工ペプチドを用いた線維化A β (10-35)の線維化増幅(ThTを用いた線維化増幅の追跡)

実施例1で合成した人工ペプチドを用いてアミロイド線維化したA β (10-35)の線維化増幅を試みた。人工ペプチド溶液に上記(1-2)の条件で線維化させたA β (10-35)を少量添加し、ThTを用いて線維化増幅を追跡した。

インキュベーション条件

・使用原料溶液:[ペプチド]=2mM TFE溶液

・濃度:[ペプチド]=200 μ M、[A β (10-35) (核)]=10 μ M

(トリス-HCl 20mM溶液(pH7. 4))

* A β (10-35) (核)は希釈前に1時間ソニケーションし、均一化した。

・温度:室温

測定条件

・濃度:[ペプチド]=5 μ M、[ThT]=6 μ M

(トリス-HCl 20mM溶液(pH7. 4))

・温度:室温

・攪拌条件:試料サンプリング前にパスツールピペットで全量を十分に攪拌

セル内でパスツールピペットを用い全量を十分に攪拌

・励起波長:440nm、検出波長:482nm

[0035] 結 果

結果を図7に示す。

図7から明らかなように、ペプチド単独でのアミロイド線維形成能が高かった10-3Lと10-4Fが核存在下で顕著な蛍光強度増大を示した。特に10-3Lは室温で核を添加したものが核を添加していないものの2倍程度の蛍光強度を示したことから、核を増幅する能力が高いことが示唆される。単独でのアミロイド線維形成能が低かった10-3F及び10-3Aは核添加、核非添加両方とも蛍光強度増大を示さず、線維増幅能も線維形成能同様に低いことが示唆された。

実施例 3

[0036] 実施例2の(2)で実施した、本発明に係る人工ペプチドを用いたアミロイド線維化し

たA β (10-35)の線維化増幅テストを、プレートリーダーを使用して試みた。

[プレートリーダーを使用した測定]

インキュベーション条件

- ・使用原料:[ペプチド]=5mM DMSO溶液
- ・濃度:[ペプチド]=20 μ M、[A β (10-35) (核)]=2.5 μ M
(トリス-HCl 20mM溶液(pH7.4))

*A β (10-35) (核)は希釈前に1時間ソニケーションし、均一化した。

- ・温度:40°C

測定条件

- ・濃度:[ペプチド]=18 μ M、[ThT]=25 μ M
(トリス-HCl 20mM溶液(pH7.4))
- ・サンプル量:200 μ l
- ・温度:30°C
- ・攪拌条件:測定前にサンプル全量をvortexで2秒間に3回
ウェル内でマイクロピペットを用い100 μ l \times 2
- ・励起波長:440nm、測定波長:490nm
- ・励起出力:30000

[0037] 結 果

結果を図8に示す。

本発明に係る人工ペプチドは、何れも核存在下で蛍光強度を増大させ、何れも30時間程度で蛍光強度増大が終了した。核非存在下では10-4Fのみ蛍光強度増大を示し、その他のペプチドは蛍光強度増大を示さなかった。この結果から、本発明に係る人工ペプチドは全て線維増幅能を持つことが判り、アミロイド線維化A β (10-35)の増幅に成功した。

線維増幅前後の蛍光強度増加度を核存在下及び非存在下について棒グラフに示した(図8)。核を添加したものの中で10-4Fがもっとも大きな蛍光強度増大を示し、10-4F、10-3L、10-3F、10-3Aの序列を示した。核を添加したもの、添加しなかったものについて蛍光強度変化終了時の差をとると10-3Lが一番大きく、以降10-4F

、10-3F、10-3Aの序列を示した。核添加、非添加で蛍光強度の差が大きいほうが検出系への応用が容易であると考えられるので、線維増幅能は10-3L、10-4F、10-3F、10-3Aの序列である。

産業上の利用可能性

[0038] 本発明に係る人工ペプチドは、体内にあるアミロイド線維の核を増幅し、検出可能な原因蛋白質を予兆段階の検査において増幅して検出可能なレベルにするための試薬として有用である。当該試薬を用いることによりアルツハイマー病やプリオン病（狂牛病やヒトのヤコブ病など）等のアミロイドーシスに起因する疾病を初期段階（予兆段階）で検出することが出来るので、本発明は斯業に貢献するところ極めて大なるものである。

請求の範囲

- [1] アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド[以下、A β (14-23)と略す。]又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化を増幅するための試薬。
- [2] A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基の1乃至複数個が他の疎水性アミノ酸残基に置換されてなるペプチドである、請求項1に記載の試薬。
- [3] A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基が全てLeuに置換されるか、ペプチド鎖内部の疎水性部位のN末端側から3残基目或いは4残基目のPheを残して全てLeuに置換されるか、又は疎水性部位のN末端側から3残基目がAlaに置換され、残りの疎水性残基が全てLeuに置換されてなるペプチドである、請求項1に記載の試薬。
- [4] アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド[A β (14-23)]又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる試薬を用いることを特徴とする、アミロイド β 蛋白質のアミロイド線維化増幅方法。
- [5] A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基の1乃至複数個が他の疎水性アミノ酸残基に置換されてなるペプチドである、請求項4に記載の方法。
- [6] A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基が全てLeuに置換されるか、ペプチド鎖内部の疎水性部位のN末端側から3残基目或いは4残基目のPheを残して全てLeuに置換されるか、又は疎水性部位のN末端側から3残基目がAlaに置換され、残りの疎水性残基が全てLeuに置換されてなるペプチドである、請求項4に記載の方法。

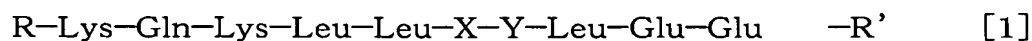
チドである、請求項4に記載の方法。

- [7] アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド[A β (14-23)]又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる、アミロイドーシスに起因する疾病の検出用試薬。
- [8] A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基の1乃至複数個が他の疎水性アミノ酸残基に置換されてなるペプチドである、請求項7に記載の検出用試薬。
- [9] A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基が全てLeuに置換されるか、ペプチド鎖内部の疎水性部位のN末端側から3残基目或いは4残基目のPheを残して全てLeuに置換されるか、又は疎水性部位のN末端側から3残基目がAlaに置換され、残りの疎水性残基が全てLeuに置換されてなるペプチドである、請求項7に記載の検出用試薬。
- [10] アミロイドーシスに起因する疾病がアルツハイマー病である請求項7-9の何れかに記載の検出用試薬。
- [11] アミロイド β ペプチドの14残基から23残基からなるペプチド[A β (14-23)]又は該ペプチドの正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドを含んでなる試薬を用いることを特徴とする、アミロイドーシスに起因する疾病の検出方法。
- [12] A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基の1乃至複数個が他の疎水性アミノ酸残基に置換されてなるペプチドである、請求項11に記載の検出方法。
- [13] A β (14-23)の正電荷側鎖アミノ酸が全てLysに置換され、且つ負電荷側鎖アミノ酸が全てGluに置換された形のペプチドが、更に、ペプチド鎖内部の疎水性残基が全てLeuに置換されるか、ペプチド鎖内部の疎水性部位のN末端側から3残基目或

いは4残基目のPheを残して全てLeuに置換されるか、又は疎水性部位のN末端側から3残基目がAlaに置換され、残りの疎水性残基が全てLeuに置換されてなるペプチドである、請求項11に記載の検出方法。

[14] アミロイドーシスに起因する疾病がアルツハイマー病である請求項11～13の何れかに記載の検出方法。

[15] 下記一般式[1]



(式中、Rは、水素原子又はアミノ基の保護基を表し、Xは、Leu、Phe又はAlaを表し、Yは、Leu又はPheを表し、R'は、OH又はNH₂を表す。)

で示されるペプチド。

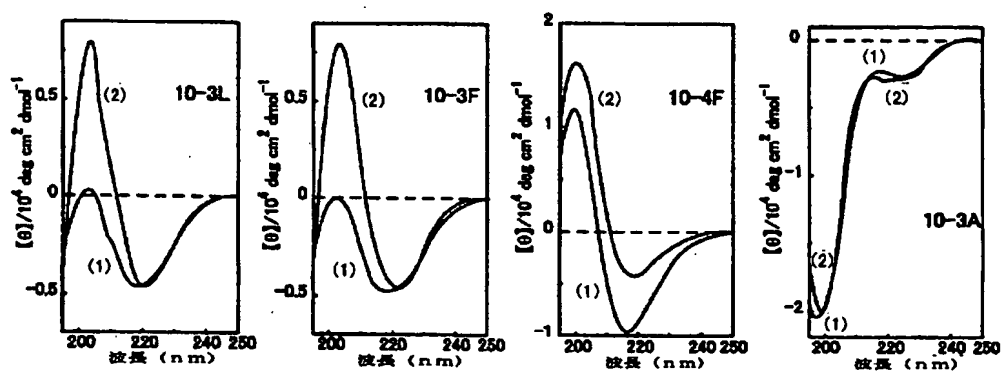
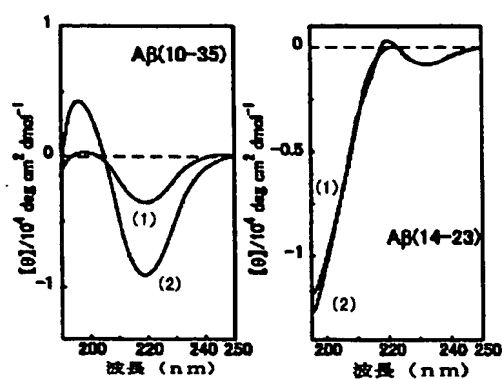
[16] 式: R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Glu-Glu-R' (式中、R及びR'は前記と同じ。)で示される請求項15に記載のペプチド。

[17] 式: R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Leu-Phe-Leu-Glu-Glu-R' (式中、R及びR'は前記と同じ。)で示される請求項15に記載のペプチド。

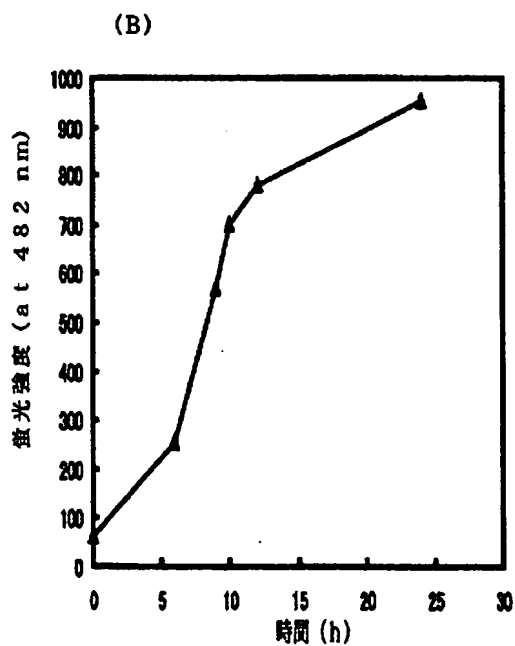
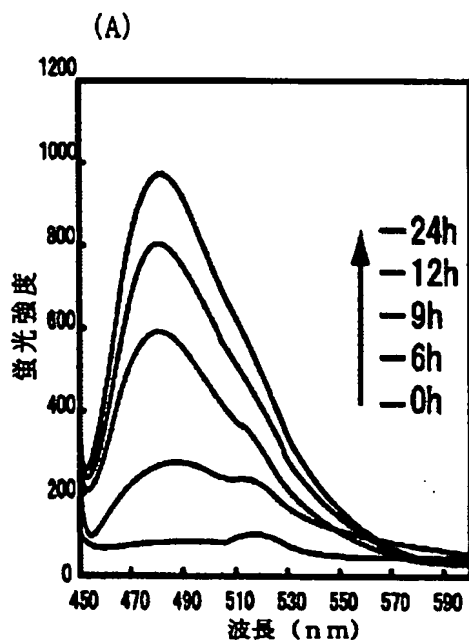
[18] 式: R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Phe-Leu-Leu-Glu-Glu-R' (式中、R及びR'は前記と同じ。)で示される請求項15に記載のペプチド。

[19] 式: R-Lys-Gln-Lys-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Glu-Glu-R' (式中、R及びR'は前記と同じ。)で示される請求項15に記載のペプチド。

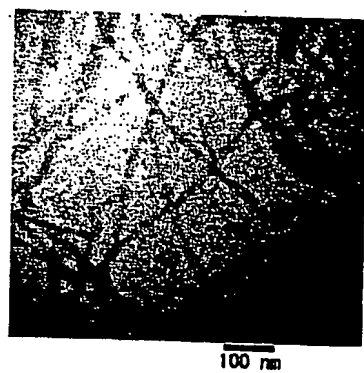
[図1]



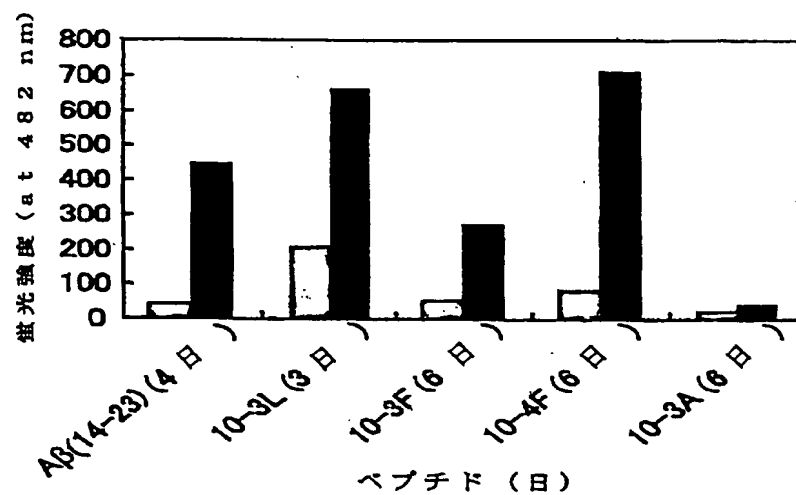
[図2]



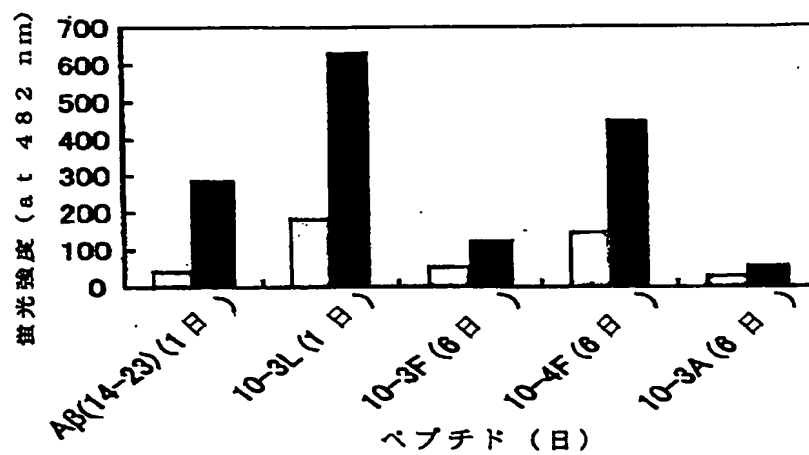
[図3]



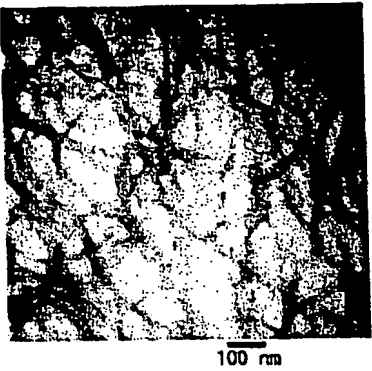
[図4]



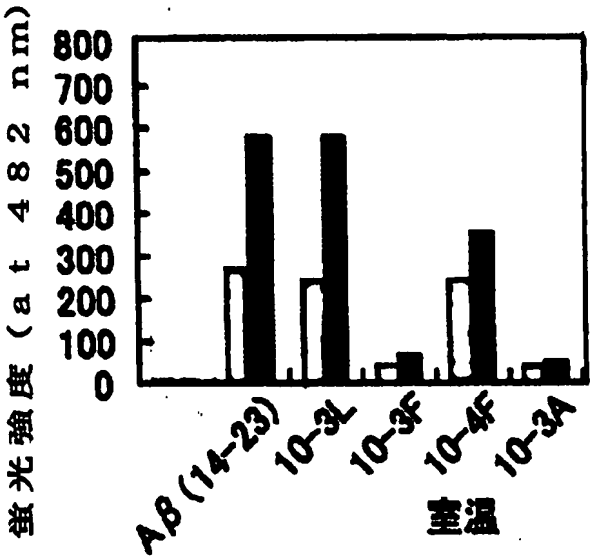
[図5]



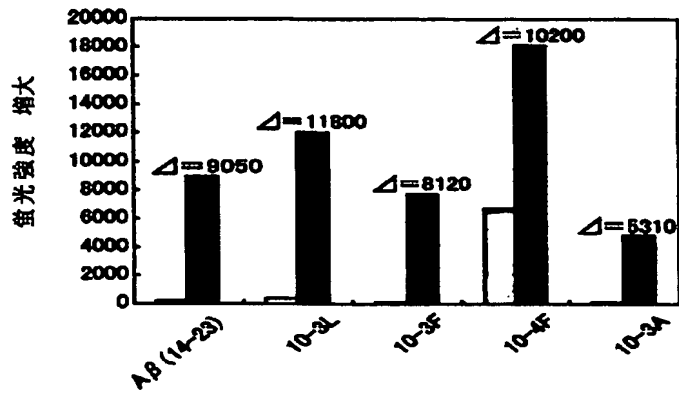
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008707

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K4/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K1/00-19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPIDS (STN), JSTPLUS FILE (JOIS),
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GORDON D.J. et al., "Inhibition of β -amyloid(40) fibrillogenesis and disassembly of β -amyloid(40) fibrils by short β -amyloid congeners containing N-Methyl amino acids at alternate residues.", Biochemistry 2001, Vol.40, pages 8237 to 8245	1-10, 15-19
A	TJERNBERG L.O. et al., "Controlling amyloid β -peptide fibril formation with protease-stable ligands.", J.Biol.Chem. 1997, Vol.272, No.19, pages 12601 to 12605	1-10, 15-19
A	MA B. et al., "Stabilities and conformations of Alzheimer's β -amyloid peptide oligomers (A β 16-22, A β 16-35, and A β 10-35): sequence effects.", Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 2002, Vol.99, No.22, pages 14126 to 14131	1-10, 15-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 July, 2004 (15.07.04)Date of mailing of the international search report
03 August, 2004 (03.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008707.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/014329 A2 (University of South Florida), 20 February, 2003 (20.02.03), & EP 1424892 A2 & US 2003/077261 A1	1-10, 15-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008707

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008707

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
These claims claim an invention relating to a method of detecting disease caused by amyloidosis, which is nothing but a method of diagnosing human. Therefore, the subject matter is not required to be searched by the International Searching Authority (Continued to extra sheet.)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008707

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

under the provisions of PCT Article 17 (2) (a) (i) and PCT Rule 39.1 (iv) .

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl¹ C07K4/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl¹ C07K1/00-19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPIDS (STN), JSTPLUSファイル (JOIS)
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GORDON D. J. et al., Inhibition of β -amyloid(40) fibrillogenesis and disassembly of β -amyloid(40) fibrils by short β -amyloid congeners containing N-Methyl amino acids at alternate residues., Biochemistry 2001, Vol. 40, p. 8237-8245	1-10, 15-19
A	TJERNBERG L. O. et al., Controlling amyloid β -peptide fibril formation with protease-stable ligands., J. Biol. Chem. 1997, Vol. 272, No. 19, p. 12601-12605	1-10, 15-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
15. 07. 2004

国際調査報告の発送日
03. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
佐久 敬

4 B 3 0 3 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MA B. et al., Stabilities and conformations of Alzheimer's β -amyloid peptide oligomers ($A\beta$ 16-22, $A\beta$ 16-35, and $A\beta$ 10-35): sequence effects., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002, Vol. 99, No. 22, p. 14126-14131	1-10, 15-19
A	WO 03/014329 A2 (University of South Florida) 2003.02.20 & EP 1424892 A2 & US 2003/077261 A1	1-10, 15-19

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-14 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
当該請求項はアミロイドーシスに起因する疾病の検出方法に係る発明であるが、これはいわゆるヒトを診断する方法に他ならない。したがって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(i v)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

PCT/JP2004/008707